

MARCO AURÉLIO LACOMBE FEIJÓ

ESTUDO DO POLISSACARÍDEO ISOLADO DA MASSA DE OVOS
DE AMPULARIA sp.

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do Pr.

CURITIBA
1973

Trabalho orientado pelo Dr. José Hazencleve Duarte

RESUMO

Um heteropolissacarídeo composto de unidades de D-galactose(98%) e fucose(2%) apresentando uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} +51,4$ (c. 0,76 em água), foi isolado da massa de ovos do molusco Ampularia sp.(Morretes). Por estudos de metilação, foi verificado que o polímero é ramificado, e contém 29,0% de resíduos ramificados(pontos de ramificação nos carbonos C₃ e C₆ de resíduos de D-galactose) e 29,5% de resíduos terminais não redutores(28,0% de resíduos de D-galactose e 1,5% de resíduos de fucose). O polímero apresenta uma alta proporção de cadeias lineares formadas de resíduos de D-galactose interligados pelos seguintes tipos de ligações glicosídicas: 26,0% do tipo(1→6), 11,0% do tipo(1→2) e 4,5% do tipo(1→3).

ABSTRACT

A heteropolysaccharide containing D-galactose(98%) and fucose(2%) residues, was isolated from the egg mass of the snail Ampularia sp(Morretes). The specific rotation was $[\alpha]_D^{25} +51,4$ (c. 0,74 in water). The highly branched character of this polysaccharide was demonstrated by methylation studies. It was shown to contain a structure of linear 1,2- , 1,3- and 1,6- linked D-galactopyranose residues (11,0% , 4,5% and 26,0% respectively) containing branches glycosidically to C₃ and C₆ of galactose residues. Branche point has been assessed by determination of 2,4-di-O-methyl-D-galactopyranose(29,0%). The branches were terminated by D-galactose(28,0%) and fucose(1,5%) residues.

ÍNDICE

		página
1.	Resumo.....	I
2.	Abstract.....	II
3.	Introdução.....	1
4.	Material e Métodos.....	7
4.1	Métodos gerais.....	7
4.2	Isolamento e purificação do polissacarídeo.....	9
4.3	Cromatografia em coluna do polissacarídeo.....	10
4.3.1	Coluna de Sephadex G-200.....	10
4.3.2	Coluna de agarose a 2%.....	11
4.3.3	Coluna de agarose a 4%.....	12
4.3.4	Coluna de Sepharose 6 B-100.....	12
4.4	Consumo de periodato e ácido fórmico liberado...	13
4.5	Degradação de Smith.....	14
4.6	Metilação do polissacarídeo.....	14
4.6.1	Processo de metilação de Haworth.....	14
4.6.2	Processo de metilação com sulfato de metila e hidróxido de sódio pulverizado.....	15
4.6.3	Processo de metilação de Sandford e Conrad.....	15
4.6.4	Processo de metilação de Purdie.....	16
4.7	Metanólise do polissacarídeo metilado.....	16
4.8	Oxidação pelo periodato dos derivados metilados do hidrolisado ácido do polímero metilado.....	17
4.9	Isolamento de derivados parcialmente metilados...	17
4.10	Hidrólise ácida do polissacarídeo purificado.....	18
5.	Resultados e Discussão.....	19
5.1	Caracterização geral do polissacarídeo da massa de ovos de <u>Ampulária sp.</u>	19
5.2	Consumo de periodato e ácido fórmico liberado do polissacarídeo.....	20
5.3	Degradação de Smith do polissacarídeo.....	20
5.4	Estudos de metilação do polissacarídeo.....	22
6.	<u>Figuras</u>	
6.1	Figura 1.....	25
6.2	Figura 2.....	26
6.3	Figura 3.....	27
6.4	Figura 4.....	28
6.5	Figura 5.....	29
6.6	Figura 6.....	30
6.7	Figura 7.....	31
7.	<u>Tabelas</u>	
7.1	Tabela I.....	32
7.2	Tabela II.....	33
7.3	Tabela III.....	34
8.	Conclusões.....	35
9.	Agradecimentos.....	36
10.	Referências bibliográficas.....	37

INTRODUÇÃO

A presença de polissacarídeos em moluscos é conhecida desde há muito. Em 1885, Hammarsten (1) verificou que a glândula de albúmen de Helix pomatia continha um polissacarídeo que não correspondia em suas propriedades ao glicogênio, e que recebeu, na época, a denominação de "tierisches Sinistrin". May (2), em 1931, demonstrou que o polissacarídeo ("tierisches Sinistrin") das partes moles totais de Helix pomatia, apresentava uma rotação ótica de $[\alpha]_D -13,55^\circ$, e propôs para esse polissacarídeo o nome de "galactogênio" em virtude do mesmo ser formado apenas de unidades de galactose (3). O próprio May (4), em 1932, comprovou que a massa de ovos de Helix pomatia continha galactogênio em alta proporção (37,8g em peso seco), com uma rotação ótica de $[\alpha]_D -22,73^\circ$. Como a rotação ótica ($[\alpha]_D +53,6^\circ$) do hidrolisado ácido de galactogênio de massa de ovos de Helix pomatia (4-5) não era compatível com aquela esperada para uma mistura de α e β -D-galactopirranose ($[\alpha]_D +80,5^\circ$), Baldwin e Bell (6) sugeriram a possibilidade de que o galactogênio de Helix pomatia fosse constituído de resíduos de D e L-galactopirranose. De fato, essa hipótese foi posteriormente confirmada por Bell e Baldwin (7) e May e Weinland (8-9), tanto nos galactogênios isolados de massa de ovos como nos de glândula de albúmen de Helix pomatia. Bell e Baldwin (7) encontraram uma relação de 6:1 para D e L-galactopirranose em galactogênio de glândula de albúmen de Helix pomatia, enquanto May e Weinland (8-9) verificaram que essa relação era de aproximadamente 7:1 em galactogênio de massa de ovos do mesmo molusco.

Weinland (10) isolou dois dissacarídeos principais do hidrolisado

ácido de galactogênio de massa de ovos de Helix pomatia, que foram caracterizados como sendo o 3-0- β -D-galactopiranosil-D-galactopiranosose e o 6-0- β -D-galactopiranosil-D-galactopiranosose. Além disso, esse autor verificou, no mesmo hidrolisado, a presença de traços de 6-0- α -L-galactopiranosil-D-galactopiranosose. Posteriormente, May e Weinland (11) demonstraram a presença de tri e pentassacarídeos no hidrolisado ácido desse galactogênio, e que eram constituídos por resíduos de galactose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3).

Schlubach e Loop (12) em 1937, metilando o galactogênio isolado das partes moles totais de Helix pomatia, foram os precursores dos estudos de metilação em galactogênio de molusco. A hidrólise ácida desse polímero metilado, produziu quantidades equimoleculares dos derivados tetra e di-metil galactose, os quais foram identificados, posteriormente, por Baldwin e Bell (6) como sendo o 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactopiranosose e o 2,4-di-0-metil-D-galactopiranosose. Baldwin e Bell (6) sugeriram que uma grande parte da molécula do galactogênio deveria possuir um tipo de estrutura possível de ser formulada de duas maneiras alternativas: a)- uma cadeia linear formada por unidades de D-galactopiranosose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3), sendo que cada unidade dessa cadeia linear estaria ligada a um resíduo de D-galactopiranosose por ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 6) (cadeia ramificada simples); b)- uma cadeia linear formada por unidades de D-galactopiranosose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6), sendo que cada unidade dessa cadeia linear estaria ligada a um resíduo de D-galactopiranosose por ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 3) (cadeia ramificada simples).

Posteriormente, Bell e Baldwin (7) apesar de haverem encontrado derivados tri-metilados no hidrolisado ácido do galactogênio de glândula de albúmen de Helix pomatia, os consideraram como resíduos incompletamente metilados, não sugerindo, por isso, nenhuma estrutura altamente ramificada para a molécula.

O' Colla (13), aplicando a degradação de Barry ao galactogênio de Helix pomatia, verificou que os dados obtidos dessa degradação não condiziam com os modelos estruturais propostos por Baldwin e Bell (6), e postulou então, uma estrutura nova, tipo arboriforme, para o galactogênio de molusco, no qual os resíduos de galactose estavam unidos por ligações glicosídicas alternadas dos tipos (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Nessa estrutura, os resíduos terminais não redutores e os resíduos internos da molécula se apresentavam em quantidades equimoleculares, permitindo, teoricamente, que o hidrolisado ácido do polissacarídeo metilado, apresentasse quantidades equimoleculares de 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactopirranose e de 2,4-di-0-metil-D-galactopirranose.

Correa, Dmytraczenko e Duarte (14) sugeriram também uma estrutura ramificada arboriforme para o galactogênio isolado de glândula de albúmen de Biomphalaria glabrata. Duarte e Jones (15) em 1971, investigando o polissacarídeo (galactano) isolado da glândula de albúmen de Strophocheilus oblongus, comprovaram, por metanólise do polissacarídeo metilado, os seguintes derivados metilados: 43 moles% de 2,3,4,6-tetra-0-metil-D-galactopirranose; 11 moles% de 2,4,6-tri-0-metil-D-galactopirranose; 2,5 moles % de 2,3,4-tri-0-metil-D-galactopirranose; 43 moles% de 2,4-di-0-metil-D-galactopirranose e 0,5 moles% de 2,3,6-tri-0-metil-D-galactopirranose. Apesar de não apresentarem modelo estrutural para o galactano, Duarte e Jones (15) verificaram que seus resultados não eram

condizentes com os modelos estruturais até então propostos. Diaz (16) em 1972, após degradação controlada de Smith realizada no galactano isolado de glândula de albúmen de Strophocheilus oblongus, sugeriu um modelo estrutural altamente complexo para esse polímero. A molécula apresentaria uma cadeia linear composta de unidades de D-galactopirranose interligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), com ramificações de cadeias complexas que, no seu conjunto, se afastaria da concepção de estrutura arboriforme proposta por O' Colla (13). Honda (17) em 1973, estudando o galactano da glândula de albúmen de Megalobolinus paranaguenses, obteve duas séries distintas de oligossacarídeos após hidrólise ácida parcial do galactano: uma linear do tipo β -(1 \rightarrow 3) e outra ramificada, apresentando uma cadeia principal linear do tipo β -(1 \rightarrow 3) com pontos de ramificação do tipo β -(1 \rightarrow 6). Honda (17) concluiu que o galactano deveria ser altamente ramificado, e formado de cadeias lineares do tipo β -(1 \rightarrow 3) de tamanho variável, interligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 6), confirmando, em parte, a estrutura proposta por Diaz (16). Nesses dois últimos trabalhos, não ficou completamente evidenciado o tamanho das cadeias ramificadas dos polímeros.

Geldmacher-Mallinckrodt e Horstmann (18) isolaram da glândula de albúmen de Helix pomatia, um heteropolissacarídeo ligado a proteína, de baixo peso molecular (7.500), o qual era formado principalmente de L-galactose e glucosamina, e apresentava uma rotação ótica de $[\alpha]_D -68,5^\circ$.

Weinland (19) demonstrou a presença de uma enzima em glândula digestiva (hepatopâncreas) e suco digestivo de Helix pomatia, capaz de hidrolisar o galactogênio contido na massa de ovos desse molusco, sem contudo elucidar seu mecanismo.

Durante o período de hibernação dos moluscos, o galactogênio está contido nas glândulas de albúmen como substância de reserva da reprodução. Se o polissacarídeo não for consumido durante esse período, desaparece da glândula de albúmen, e um polissacarídeo provavelmente idêntico deve ser encontrado na massa de ovos (13). May (20) observou que, após a hibernação, a quantidade de galactogênio encontrada na massa de ovos recente de Helix pomatia, era maior do que o decréscimo da quantidade do referido polímero verificado na glândula de albúmen, sugerindo a possibilidade de uma transformação de glicogênio em galactogênio. O próprio May (21) verificou, no entanto, que na massa de ovos recente do Helix pomatia não havia glicogênio, só sendo possível sua determinação após o 16^o dia do desenvolvimento embrionário. Horstmann (22), trabalhando com polímero semelhante, isolado da massa de ovos de Lymnaea stagnalis, observou que 46 a 78% do galactogênio era consumido durante o período embrionário desse molusco (25 dias), e que o glicogênio, mesmo em baixa proporção, só aparecia tardiamente, ou seja, na metade desse período.

Recentemente, Sampaio (23) isolou de glândula de albúmen de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria tenagophila, uma lectina (hemoaglutinina) em alto grau de pureza, que apresentava galactose como principal componente glicídico. Entretanto não ficou esclarecido o significado biológico dessa lectina para o molusco.

Apesar do grande número de trabalhos realizados sobre química de carboidratos em galactanos, muitos aspectos estruturais desses polímeros permanecem ainda quase que inteiramente desconhecidos. Também o verdadeiro mecanismo de síntese e degradação biológica dos galactanos

não foram ainda esclarecidos, quer na glândula de albúmen, quer na massa de ovos.

A finalidade do presente trabalho é contribuir para o esclarecimento da estrutura do galactano isolado da massa de ovos, afim de que sua estrutura possa ser comparada com aquela do galactano isolado de glândula de albúmen de molusco da mesma espécie. Um estudo comparativo dessa natureza, contribuirá para o esclarecimento do mecanismo de degradação enzimática do galactano presente na massa de ovos de molusco. Com essa finalidade, foi selecionada a massa de ovos de Ampularia sp. (Morretes) como fonte de obtenção de galactano.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Métodos gerais.

As rotações óticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 a 25°C. A análise por eletroforese foi realizada em papel acetilado (Cellogel) segundo o método de Dudman e Bishop (24) em aparelho Fanem com câmara de imersão da Chemetron. A cromatografia em fase gasosa (GLC) foi realizada em cromatógrafo F&M modelo 810 R-12 com detetor de ionização de chama, utilizando-se hélio como gás de arraste. As seguintes colunas foram utilizadas: (a) 15% p/p de políester de succinato de butano-1,4-diol sobre Celite de 80-100 mesh, em coluna de 120 x 0,4 cm (d.i.) a 175°C (25), com detetor a 235°C, câmara de injeção a 200°C e fluxo de hélio de 40 ml/min.; (b) 10% p/p de polifenil eter [m-bis (m-fenoxi-fenox) benzeno] sobre Celite de 80-100 mesh, em coluna de 120 x 0,4 cm (d.i.) a 185°C (25), com detetor a 235°C, câmara de injeção a 200°C e fluxo de hélio de 75ml/min.; (c) 14% p/p LAC-4 R-886 sobre Chromosorb W de 80-100 mesh (DMSC), em coluna de 100 x 0,4 cm (d.i.) a 160°C (26), com detetor a 250°C, câmara de injeção a 220°C e fluxo de hélio de 40 ml/min.; (d) 1:1 v/v da mistura de 10% de políester de butanodiol succinato sobre Chromosorb W de 60-80 mesh e 10% p/p de Apiezon M sobre Chromosorb W de 60-80 mesh coberto com prata, em coluna de 120 x 0,4 cm (d.i.) a 175°C (27), com detetor a 245°C; câmara de injeção a 200°C e fluxo de hélio de 75 ml/min.; (e) 3% p/p de ECNSS-M em Gas Chrom Q de 100-120 mesh, em coluna de 120 x 0,6 cm (d.i.) (28), utilizada com temperatura programada (140-195°C, 10°C/min.) com detetor a 250°C, câmara de injeção a 175°C e fluxo de hélio de 10 ml/min. O Chromosorb W coberto com prata foi fornecido por Instrumentos Científicos C.G. Ltda. São Paulo-Brasil. Os demais produtos utilizados em GLC foram fornecidos pela Chromatographic Specialities-Brockville-Canadá.

Os tempos de retenção dos metil-galactosídeos metilados em GLC foram referidos ao β -0-metil-2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-glucosídeo nas colunas (a), (b) e (c). A análise quantitativa dos derivados metilados foi realizada apenas na coluna (c) de acordo com Stephen et al. (26). A análise em GLC dos derivados acetilados (alditol acetatos) foi realizada na coluna (d) (27), sendo os tempos de retenção desses derivados, referidos ao L-arabinitol pentacetato. A coluna (e) foi usada para análise quantitativa de alditol acetatos, com utilização de programação de temperatura. Em todas as análises por GLC, as áreas foram calculadas por triangulação (28). A cromatografia em papel foi realizada pelo método descendente com papel Whatmann nº 1, nº 4 e 3MM nos seguintes sistemas de solventes (v/v): (f) 1:5:3:3 (fase superior) benzeno-n-butanol-piridina-água; (g) 8:2:1 acetato de etila -piridina-água; (h) 9:2:2 acetato de etila-piridina-água; (i) 200:17:1 butanona-água-amônia. Os açúcares foram visualizados com nitrato de prata alcalino (29) ou cloridrato de p-anisidina (derivados metilados) (30). A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de vidro ou de alumínio cobertas com Silica Gel G segundo Stahl, tendo sido utilizados os seguintes sistemas de solventes (v/v): (j) 9:1 benzeno-metanol; (l) 20:1 benzeno; acetato de etila; (m) 5:1 clorofórmio-metanol; (n) 200:47:15:1 benzeno-etanol-água-ácido acético. Os açúcares foram visualizados com solução de ácido sulfúrico a 5% em metanol, seguido de aquecimento em estufa a 150°C. A corrida dos açúcares livres em cromatografia em papel foi relacionada a da D-galactose (R_{gal}), e o movimento dos derivados metilados foi relativo ao do 2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-glucosídeo (R_g). Dois processos foram utilizados para acetilação dos açúcares:

(1) anidrido acético-piridina, 1:1, 3(v/v) a 100°C, durante 4 horas. Esta mistura foi tratada com água (2-4°) e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina contida nesta solução foi eliminada por tratamentos sucessivos com solução de ácido sulfúrico 2 N. Por sua vez, o excesso deste ácido foi neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio. (2) anidrido acético-ácido perclórico a 70% 14:0,1 (v/v) a 35°C com agitação constante por 2 horas. Esta mistura foi tratada com água (2-4°) e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio, sendo que o excesso de ácido perclórico foi neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio. A hidrólise total do polissacarídeo foi feita em ampola selada, utilizando-se ácido sulfúrico 1N a 100°C durante 6 horas. O excesso de ácido foi eliminado por precipitação com carbonato de bário até pH 4,5. O açúcar total foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (31).

2. Isolamento e purificação do polissacarídeo

Os moluscos utilizados no presente trabalho (Ampularia sp.) foram coletados no município de Morretes, Paraná, Brasil. Esses moluscos foram mantidos em aquário durante a coleta das massas de ovos. Essas massas de ovos (110 unidades), foram coletadas diretamente das paredes dos aquários, 6 a 12 horas após a oviposição, e conservadas em acetona a 0-2°C. Após trituração com acetona em liquidificador, o material foi centrifugado, e o resíduo tratado com uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) e novamente centrifugado. O resíduo assim obtido foi tratado com n-butanol saturado com água, em refluxo, à temperatura de 100°C durante 6 horas. Após filtração, desta mistura, o resíduo obtido foi lavado com acetona, seco à temperatura ambiente e, em seguida a vácuo (dessecado com pentóxido de fósforo). O pó cetônico assim obtido (21 g) foi

submetido a ação de enzima proteolítica (subtilisina, tipo VII, Sigma; 2 x 150 mg) em solução de acetato de amônia (pH 8,5) num volume total de 600 ml. Essa solução contendo cloreto de cálcio na concentração final de 0,005 M, foi conservada a 37°C durante 72 horas. Após esse tempo, o sistema de reação foi centrifugado, sendo o resíduo (formado principalmente de carbonato de cálcio) desprezado, e o sobrenadante dialisado contra água corrente durante 24 horas. Após diálise, a solução contendo o polissacarídeo, foi centrifugada, o sobrenadante tratado com etanol (3 volumes) e centrifugado. O resíduo obtido foi submetido ao processo de Sevag (32) (6 vezes). Após nova centrifugação, a fração aquosa do processo de Sevag foi tratada com etanol (3 volumes), e outra vez centrifugada. O resíduo obtido foi lavado com acetona, seco à temperatura ambiente e, em seguida, a vácuo. Nessa fase, foram obtidas 2,5 g de polissacarídeo (dosado pelo método do fenol-ácido sulfúrico), correspondendo a 12% do pó cetônico. Em seguida, a fração contendo o polissacarídeo (2,5g) foi submetida a processo de fracionamento, utilizando base quaternária de amônia (brometo de hexadeciltrimetilamônio) em presença de tampão borato a diferentes pH, segundo processo descrito por Duarte e Jones(15). Após esse tratamento, foram obtidas 1,3 g de polissacarídeo (dosado pelo método do fenol-ácido sulfúrico), correspondendo a 6,3% do pó cetônico, com rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} + 51,4^\circ$ (0,76 em água).

3. Cromatografia em coluna do polissacarídeo.

I- Coluna de Sephadex G-200

Uma amostra de polissacarídeo (6,5g) foi cromatografada em coluna de Sephadex G-200 (80 x 2 cm.) e eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 8 ml/hora. Frações de 2 ml de eluato foram

coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações, Buchler Instruments). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação do açúcar total. As frações contendo o polissacarídeo (eluatos correspondentes aos volumes de 96 a 117 ml, com pico máximo em 107ml de eluato) foram reunidas e o açúcar total determinado nessa fração (6,5 mg) correspondeu a uma recuperação de 100% do polissacarídeo (figura 1). O "Dextran-blue 2.000" foi eluído dessa coluna com água destilada nos volumes de eluição entre 96 a 116 ml, com pico máximo no volume de 106 ml.

II- Coluna de agarose a 2%.

Uma amostra do polissacarídeo (5,7mg) foi cromatografada em coluna de agarose a 2% (90,0 x 1,5 cm. d.i.) e eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 3 ml/hora. Frações de 0,5ml de eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação do açúcar total. As frações contendo polissacarídeo (eluatos correspondentes aos volumes de 56,5 a 65,0ml, com pico máximo em 60 ml de eluato) foram reunidas, e o açúcar total determinado nessa fração (5,16mg) correspondeu a 90% de recuperação do polissacarídeo (figura 2). O "Dextran-blue 2.000" não foi eluído dessa coluna com água, tendo sido adsorvido no topo da coluna. A agarose a 2% foi preparada do seguinte modo: 2 g de agarose foram suspensas em 100 ml de água destilada e aquecida em banho-maria fervente (95°C) até formação de gel (30 min.). Após resfriamento, o gel foi passado por tamís de 50 mesh, e as partículas assim obtidas foram lavadas exaustivamente com água destilada afim de eliminar as partículas de difícil sedimentação.

III - Coluna de agarose a 4%.

Uma amostra do polissacarídeo (6,56 mg) foi cromatografada em coluna de agarose a 4% (90,0 x 2,1 cm d.i.) e eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 4ml/hora. Frações de 1ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada fração foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação de açúcar total. As frações contendo polissacarídeo (eluatos correspondentes aos volumes de 118 a 155 ml, com pico máximo em 133ml de eluato), foram reunidas, e o açúcar total determinado nessa fração (6,17 mg) correspondeu a 94% de recuperação do polissacarídeo (figura 3). O "Dextran-blue 2.000" foi eluído dessa coluna com água destilada nos volumes de eluição entre 115 e 130 ml, com pico máximo no volume de eluição de 120 ml. A agarose a 4% foi preparada da mesma maneira que a agarose a 2%, variando apenas sua concentração (4g de agarose para 100 ml de água destilada).

IV - Coluna de Sepharose 6B-100.

Uma amostra de polissacarídeo (3,7 g) foi cromatografada em coluna de Sepharose 6 B-100 (Pharmacia-Uppsala-Suécia) (97,0 x 1,7 cm d.i.) e eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 12ml/hora. Frações de 2 ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada fração foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação de açúcar total. As frações contendo polissacarídeo (eluatos correspondentes aos volumes de 46 a 70 ml, com pico máximo em 58 ml do eluato), foram reunidas, e o açúcar total determinado nessa fração (3,66mg) correspondeu a uma recuperação de 99% do polissacarídeo (figura 4). O "Dextran-blue 2.000" foi eluído dessa coluna com água destilada nos volumes de eluição entre 48 a 68ml, com pico máximo no volume de 55 ml do eluato.

As colunas I, II, III e IV só foram utilizadas no presente trabalho, quando o eluato aquoso não apresentava absorção na região ultra-violeta(Beckman DU), e não acusava a presença de açúcar pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

4. Consumo de periodato e ácido fórmico liberado

Uma amostra do polissacarídeo original(50mg) foi oxidada com m-periodato de sódio 0,01 N (100ml), na ausência de luz, durante 94 horas a 0-2°C. Da solução oxidante foram retiradas alíquotas a diferentes intervalos de tempo para determinação do consumo de periodato(33), que foi calculado do seguinte modo:

$$\text{Molaridade da solução oxidante} = x = \frac{(B-A) \cdot N \text{ do tiosulfato}}{\text{ml da alíquota} \cdot 2}$$

$$\frac{\text{Moles de periodato}}{\text{Mol de hexose anidra}} = \frac{\text{Volume total da solução oxidante} \cdot x \cdot 162}{\text{g do polissacarídeo} \cdot 10^3}$$

Onde:

B= ml de tiosulfato gastos na titulação do branco

A= ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra

Do gráfico representativo(moles de periodato/mol de hexose anidra), foi extrapolado o valor do consumo de periodato para o tempo zero(figura 5).

O ácido fórmico liberado no sistema de oxidação, foi determinado pelo método de Barker e Somers(34), e por titulação potenciométrica em atmosfera de nitrogênio(35). O cálculo foi feito com a seguinte equação:

$$\frac{\text{Moles de ácido fórmico liberados}}{\text{Mol de hexose anidra}} = Y$$

$$Y = \frac{\text{ml de NaOH} \cdot N \text{ da NaOH} \cdot \text{Volume da solução oxidante} \cdot 162}{\text{ml da alíquota} \cdot \text{g do polissacarídeo} \cdot 10^3}$$

5. Degradação de Smith (36)

Uma amostra do polissacarídeo original (50 mg) foi oxidada durante 94 horas com m-periodato de sódio como já descrito, acrescentando-se após esse tempo, 1 ml de etilenoglicol para eliminar o excesso de periodato. Após 30 minutos, a solução foi submetida a diálise contra água corrente por 24 horas, e concentrada a vácuo até um volume de aproximadamente 20 ml. Em seguida, o polissacarídeo oxidado foi reduzido com NaBH_4 (50 mg) por 10 horas. Após esse tempo, a solução foi tratada com ácido acético 2N (pH 7,0) para destruir o excesso de NaBH_4 e, em seguida, submetida a diálise por 24 horas contra água corrente, e concentrada a vácuo até um volume de aproximadamente 5 ml. Em seguida, o polissacarídeo reduzido, foi hidrolisado com ácido sulfúrico 2N por 5 horas a 100°C , e o hidrolisado ácido foi neutralizado com carbonato de bário (pH 4,5). Os produtos desta hidrólise foram novamente reduzidos com NaBH_4 (50mg) durante 24 horas e o excesso do NaBH_4 destruído com ácido acético 2N. Em seguida, a solução foi deionizada em coluna trocadora de ions (Dowex 50 W-X-8 de 200 a 400 mesh, forma H^+). O eluato dessa coluna foi concentrado a vácuo (evaporador rotatório $40-45^\circ\text{C}$), e o excesso de ácido bórico da preparação foi eliminado à vácuo por tratamentos sucessivos com metanol. Em seguida, os alditois obtidos, foram acetilados por processos já descritos (Métodos gerais), e os alditois acetatos foram analisados por cromatografia em papel e GLC. (Tabela I).

6. Metilação do polissacarídeo.

a) - Processo de metilação de Haworth (37)

Uma amostra do polímero (lg) foi submetida inicialmente ao processo de metilação de Haworth do seguinte modo: o polímero (lg) foi

dissolvido em água (10ml) e tratado com 50 ml de NaOH a 40% e 25 ml de dimetilsulfato. Esses reagentes foram acrescentados à solução do polímero gota a gota, durante 4 horas sob agitação (agitador magnético) e à temperatura ambiente. Durante esse processo de metilação, acrescentou-se acetona (20ml) para solubilizar o polissacarídeo parcialmente metilado. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido sulfúrico 6N (pH 7,0), dialisada contra água corrente durante 48 horas e, finalmente, concentrada a vácuo. Esse processo de metilação foi repetido nessa amostra por mais 3 vezes. No final dessa etapa de metilação, houve recuperação de 0,9 g de polissacarídeo parcialmente metilado (90% de rendimento).

b)- Processo de metilação com sulfato de metila e hidróxido de sódio pulverizado (38-39)

O polissacarídeo parcialmente metilado (0,9g) foi dissolvido em tetrahidrofurano (50 ml), e tratado com NaOH pulverizado (10g) e sulfato de metila (12ml), gota a gota. A mistura de reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação constante (agitador magnético) durante 16 horas. Após esse tempo, o solvente foi evaporado a vácuo, e o resíduo solubilizado com água (20ml) foi neutralizado com ácido sulfúrico 6N (pH 7,0). Após diálise, a solução contendo o polissacarídeo parcialmente metilado, foi finalmente liofilizada. Esse processo de metilação foi repetido por mais 3 vezes, e apresentou em seu final, uma recuperação de 0,85g de polissacarídeo parcialmente metilado (85% de rendimento).

c)- Processo de metilação de Sandford e Conrad (40)

O polissacarídeo parcialmente metilado (0,85 g) foi submetido ao processo de metilação descrito por Sandford e Conrad, que apresentou, em

seu final, uma recuperação de 0,8g do polímero parcialmente metilado (80% de rendimento).

d) - Processo de metilação de Purdie (41)

A solução de polissacarídeo parcialmente metilado (0,8g) em iodeto de metila (19 ml), foi acrescentado óxido de prata (6,5g). Essa mistura, após refluxo na temperatura de aproximadamente 50°C com agitação (agitador magnético), foi filtrada (funil de placa porosa). O resíduo dessa filtração foi lavado com acetona (8x10ml). Os filtrados foram reunidos e concentrados a vácuo em evaporador rotatório da Buchler (40°C). Esse resíduo, contendo o polissacarídeo e sais de prata coloidal, foi dissolvido em clorofórmio (0,5ml) e tratado com 2,5ml de éter de petróleo (P.E. 30 a 60°C). Após centrifugação, o resíduo foi desprezado (sais de prata). Ao sobrenadante foram acrescentados mais 7 ml de éter de petróleo e, após centrifugação, obteve-se, no sedimento, o polissacarídeo metilado. Esse processo foi repetido por mais 3 vezes afim de se obter o polímero livre de sais de prata. Após esse processo de metilação, o polissacarídeo metilado, (0,5 g; rendimento de 50%) apresentava uma rotação ótica de $\left[\alpha \right]_D^{25} - 10.0$ (1 % em clorofórmio).

7. Metanólise do polissacarídeo metilado.

Uma amostra do polissacarídeo metilado (100 mg) foi dissolvida em ácido clorídrico a 5% em metanol (10 ml) e aquecido por 6 horas a 100°C em ampola selada. Após neutralização com carbonato de prata, a solução foi filtrada, e o filtrado submetido a corrente de ácido sulfídrico (H₂S) para precipitar os sais de prata. Após centrifugação, o sobrenadante foi evaporado a vácuo até secar e dissolvido em clorofórmio para análise em GLC, (Tabela II), e figura 6.

8. Oxidação pelo periodato dos derivados metilados do hidrolisado ácido do polímero metilado.

Uma amostra do polímero metilado (10mg) foi submetida a metanólise e os produtos parcialmente metilados foram tratados com HCl 0, 5N (2 ml) a 100°C por 5 horas segundo o método descrito por Parikh e Jones (42). Os açúcares parcialmente metilados assim obtidos (forma redutora, 10 mg), foram submetidos a oxidação com m-periodato de sódio na concentração final de 0, 05M, na ausência de luz, à temperatura de 18-20°C durante 2 horas. Após esse tempo, o excesso de periodato foi destruído por adição de inositol (10 mg), (30 minutos de reação). Após liofilização, o resíduo obtido foi exaustivamente extraído com clorofórmio à temperatura ambiente. Os extratos clorofórmicos foram reunidos e concentrados a vácuo, e o resíduo contendo os açúcares parcialmente metilados, foi submetido ao processo de glicosidação de Fischer afim de se obter os metil-glicosídeos metilados (processo de Fischer foi realizado do mesmo modo como descrito para metanólise do polissacarídeo metilado). Por análise em GLC (coluna c) desses metil-glicosídeos metilados, foi possível se visualizar os picos correspondentes a uma mistura de α e β metil-2, 4, 6-tri-0-metil-D-galactosídeo, e assim realizar sua determinação quantitativa por triangulação (tabela II). Também por esta análise em GLC foi possível se demonstrar o desaparecimento do pico com tempo de retenção (T) de 5, 62 e sua transformação em pico de tempo de retenção de 12, 2 (ver tabela III e figuras 6 e 7).

9. Isolamento de derivados parcialmente metilados.

Uma amostra de polímero metilado (10 mg) foi submetida

a metanólise e os metil-glicosídeos parcialmente metilados foram submetidos a cromatografia preparativa em camada delgada, utilizando-se placas de alumínio (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel G, segundo Stahl (solvente n). Após duas migrações sucessivas neste solvente, uma faixa desta placa (2 x 20 cm) foi removida (guilhotina) e os açúcares foram visualizados com solução de ácido sulfúrico a 5% em etanol (aquecimento a 150°C). Reconstituindo-se a placa original, foi possível isolar-se cinco faixas distintas contendo os metil-glicosídeos metilados, que foram analisados por GLC (parte destes resultados se encontra na tabela III).

10. Hidrólise ácida do polissacarídeo purificado.

Uma amostra do polissacarídeo (10 mg) foi hidrolisada com ácido sulfúrico 1 N (1 ml) durante 5 horas a temperatura de 100°C. Após neutralização do ácido (carbonato de bário pH 4,5), e concentração a vácuo (evaporador rotatório), os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em papel (solvente f), e visualizados com p-anisidina. Uma parte dos açúcares deste hidrolizado foi reduzida com boridreto de sódio e os alcoois resultantes foram acetilados (piridina-anidrido acético). Os alditóis acetatos resultantes foram analisados por GLC (colunas (d) e (e)), que revelou a presença de fucitol pentacetato (2%) e galactitol hexacetato (98%), confirmando a presença desses dois monossacarídeos, já observada em cromatografia de papel. A rotação ótica observada em hidrolizado foi de $[\alpha]_D^{25} + 80^{\circ}$ (C, 0,9 em água) (ácido sulfúrico 2N durante 14 horas a 100°C). A galactose desse hidrolizado foi cristalizada em etanol (P.F. 160°C), e o ácido múcico obtido da oxidação com ácido nítrico foi cristalizado em água (P.F. 219°C). A galactose cristalizada (etanol), apresentou uma rotação ótica de $[\alpha]_D^{25} + 80,5^{\circ}$ (C, 0,9 em água).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização geral do polissacarídeo da massa de ovos de Ampularia sp.

A massa de ovos de Ampularia sp. (coletadas 6-12 horas após a oviposição) contém uma baixa concentração de polissacarídeo (6,3%, em pó cetônico), em contraste com a elevada proporção verificada por May (4) de 37,8% (peso seco), e por Horstmann (22) de 36% em massas de ovos, respectivamente, de Helix pomatia e Lymnaea stagnalis. No hidrolisado ácido do pó cetônico da massa de ovos de Ampularia sp., não foi detectada a presença de D-glucose (cromatografia em papel) mas apenas D-galactose, fucose e traços de hexosaminas, comprovando a observação de Horstmann (22) que nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, a massa de ovos dos moluscos não contém glicogênio. Também a rotação ótica do polissacarídeo, $[\alpha]_D^{25} + 51,4^\circ$ (C, 0,76 em água), não correspondeu àquela obtida por May (4), de $[\alpha]_D - 22,73^\circ$, para o polissacarídeo da massa de ovos de Helix pomatia. A hidrólise ácida do polissacarídeo de Ampularia sp. revelou a presença de galactose e fucose (cromatografia em papel) numa proporção de 98% e 2% respectivamente (GLC). A rotação ótica do hidrolisado ácido e da galactose cristalizada em etanol, $[\alpha]_D^{25} + 80^\circ$ e $[\alpha]_D^{25} + 80,5^\circ$, respectivamente, não é compatível com a presença, nesse polímero, de L-galactose, o que o diferencia ainda mais daqueles investigados por May e Weinland (8-9), Bell e Baldwin (7) e Geldmacher - Mallinckrodt e Horstmann (18) em massa de ovos e glândula de albúmen em Helix pomatia. Deste modo, o polissacarídeo da massa de ovos de Ampularia sp. (Morretes), considerado como um heteropolissacarídeo, recebeu a denominação de fucogalactano, que adotaremos no presente trabalho.

O exame desse polímero por eletroforese em papel acetilado e cro-

matografia em colunas de Sephadex G-200, agarose a 2%, agarose a 4% e Sepharose 6 B-100 (Figuras 1, 2, 3, 4), demonstraram que o polímero era homogêneo ou, pelo menos, formado de uma mistura de polissacarídeos indissociável nas condições do experimento e, como tal, considerado apto para estudos estruturais.

2. Consumo de periodato e ácido fórmico liberado do polissacarídeo.

Dos resultados do consumo de periodato (1,10 moles/mol de hexose anidra, Figura 5) e dos da liberação de ácido fórmico (0,47 moles/mol de hexose anidra), foi possível se calcular uma proporção aproximada das possíveis ligações glicosídicas presentes no polímero, na seguinte relação: 16 moles % de resíduos que consomem 1 mol de periodato/mol de hexose anidra, sem liberar ácido fórmico, tais como resíduos apresentando ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 2)p e (1 \rightarrow 4)p ou do tipo (1 \rightarrow 2)f, (1 \rightarrow 3)f e (1 \rightarrow 5)f; 47 moles% de resíduos que consomem 2 moles periodato/mol de hexose anidra e liberam 1 mol de ácido fórmico/mol de hexose anidra, tais como resíduos apresentando ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6)p (cadeias lineares) e resíduos terminais não redutores; 37 moles% de resíduos não suscetíveis a oxidação com periodato, tais como resíduos apresentando ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 3)p ou resíduos piranosídicos com ramificações nos carbonos C₃ e C₆, C₂ e C₃, C₃ e C₄, C₂ e C₄.

3. Degradação de Smith do polissacarídeo.

Os resultados obtidos da degradação de Smith (28 moles % de dulcitol-hexacetato e 72 moles % de glicerol-triacetato; tabela I) permitiram excluir, neste polímero, a presença de ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4)p e (1 \rightarrow 5)f (ausência de treitol-tetracetato), e de ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 2)f e (1 \rightarrow 3)f (ausência de pentitol pentacetato).

Por outro lado, os dados dessa degradação indicariam a possibilidade deste polímero ser formado de resíduos não suscetíveis a oxidação com periodato, na proporção de 28% (mistura de resíduos com ligações glicosídicas do tipo (1→3)p e de resíduos ramificados como referido anteriormente), além de 72% de resíduos suscetíveis de liberarem glicerol durante o processo de degradação.

A percentagem de glicerol (72%) verificada nessa degradação, poderia ser atribuída, entre outras, às seguintes possibilidades: a) à presença de cadeia (s) linear (s) constituída (s) de resíduos apresentando ligação glicosídica do tipo (1→6)p; b) à presença de resíduos terminais não redutores; c) à presença simultânea de cadeias lineares e resíduos terminais sugeridos em (a) e (b). Estas possibilidades, contudo, não eram compatíveis com os dados de consumo de periodato e ácido fórmico liberado pelo polímero durante o processo de oxidação. Sabe-se que, a percentagem de resíduos liberando ácido fórmico (moles %) durante o processo de oxidação com periodato, deve corresponder à mesma percentagem de resíduos produzindo glicerol (moles %) na degradação de Smith. Entretanto, nem todos os resíduos que na degradação de Smith produzem glicerol, liberam ácido fórmico durante o processo de oxidação com periodato. Neste último caso se enquadram os resíduos que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1→2), e resíduos com ramificações nos carbonos C₂ e C₆. O consumo de periodato destes resíduos é de 1 mol de periodato/mol de hexose anidra, contra uma produção de 2 moles de glicerol/mol de resíduo, na degradação de Smith. A existência deste tipo de ramificação foi afastada por estudo de metilação neste polímero, como será demonstrado posteriormente. Admitindo-se a presença de ligação glicosídica do tipo (1→2) na estru-

tura do polímero em estudo, obtem-se uma maior concordância dos dados da oxidação com periodato e da degradação de Smith. De fato, estes dados, agora analisados em conjunto, sugerem para este polissacarídeo, a seguinte composição: 16 moles % de resíduos que apresentam ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 2)p; 47 moles % de uma mistura de resíduos terminais não redutores e de resíduos apresentando ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6)p (cadeias lineares); 37 moles % de resíduos não suscetíveis à oxidação com periodato. Um polímero com esta composição, produziria por degradação de Smith teórica, 68 moles % de glicerol contra 72 moles % de glicerol obtidos experimentalmente. A percentagem de resíduos não suscetíveis à oxidação com periodato (32 moles %), também se aproxima do valor obtido experimentalmente da degradação de Smith (28 moles %).

4. Estudos de metilação do polissacarídeo.

Os dados da análise por GLC dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado da massa de ovos de Ampularia sp., se encontram na Tabela II. Os açúcares metilados foram identificados pelos seus tempos de retenção (T) segundo Aspinall (25) e Stephen et al (26), exceto o derivado metil 3,4,6-tri-O-metil-D-galactopiranosídeo, que foi identificado indiretamente, de acordo com as seguintes considerações teóricas: este derivado (na forma redutora) submetido a oxidação com periodato nos carbonos C₁ e C₂, por tratamento com HCl a 5% em metanol, daria origem a uma pentose metilada (2,3,5-tri-O-metil-D-lixose). Por outro lado, é conhecido que a percentagem de formas piranosídicas (α e β) e de formas furanosídicas (α e β) da lixose (forma redutora) presente em equilíbrio em solução aquosa (40°C), tende para a conformação piranosídica

(< de 1% para formas furanosídicas) (43). Desse modo, a lixose metilada obtida de um experimento como acima resumido (ver Material e Métodos, item 8), provavelmente deveria se encontrar numa forma acíclica, já que a hidroxila do carbono C₅ de sua estrutura se encontraria metilada, o que impediria sua ciclização numa conformação estável (forma piranosídica). Isto ocorrendo, o derivado 2, 3, 5-tri-0-metil-D-lixose (forma acíclica) quando submetido ao processo de glicosidação de Fischer, daria origem a um derivado metilado na forma de acetal, cuja estabilidade não é discutida no presente trabalho.

A comprovação, embora indireta, da existência de ligação glicosídica do tipo (1→2) no polissacarídeo em estudo, foi realizada pela análise comparativa em GLC dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, antes e após a oxidação com m-periodato. Os dados da tabela III e das Figuras 6 e 7, indicaram que o derivado metilado com tempo de retenção (T) 5, 62 (coluna c) desapareceu (Figura 7) após o processo oxidativo, dando origem a um derivado metilado com tempo de retenção (T) 12, 20. Estes dados sugerem que o composto com tempo de retenção (T) 5, 62 corresponda ao derivado metilado 3, 4, 6-tri-0-metil-D-galactopiranosose (já obtido em alto grau de pureza, conforme análise em GLC; Tabela III), e aquele com tempo de retenção (T) retardado (12, 20) corresponda ao derivado metilado 2, 3, 5-tri-0-metil-D-lixose, provavelmente numa forma acíclica. (A síntese destes compostos está sendo tentada neste Departamento).

Na estrutura de um polissacarídeo sugerida pelos dados de metilação (Tabela II), obteria-se de uma oxidação teórica com periodato, 1, 22 moles de periodato/mol de hexose anidra e 0, 54 moles de ácido fórmico/mol de hexose anidra, dados que se aproximam dos valores experimentais

(1.1 e 0.47, respectivamente). Nesta molécula, uma degradação de Smith teórica, produziria 70% de glicerol e 30% de dulcitol (GLC), valores estes teóricos que também se aproximam dos valores obtidos experimentalmente (72% e 28% respectivamente).

Em resumo podemos concluir, dos dados de metilação, que o polímero é menos ramificado (29,5 moles% de resíduos terminais não redutores), e mais rico em cadeias lineares (41,5 moles % de resíduos constituindo cadeias lineares) do que o galactano de glândula de albúmen de Strophochellus oblongus (15). Estas cadeias lineares são formadas por resíduos de D-galactose unidos por ligações glicosídicas dos tipos (1→2) (11,0 moles %); (1→3) (4,5 moles %) e (1→6) (26 moles %). Os resíduos terminais não redutores desta molécula, além de D-galactose (28,0 moles %), contêm fucose (1,5 moles %). Os pontos de ramificação nesta estrutura estão nos carbonos C₃ e C₆ de resíduos de D-galactose (29,0 moles %).

Deste modo, o polissacarídeo da massa de ovos de Ampularia sp., não se assemelha estruturalmente aos polissacarídeos previamente estudados em massas de ovos de moluscos de outras espécies.

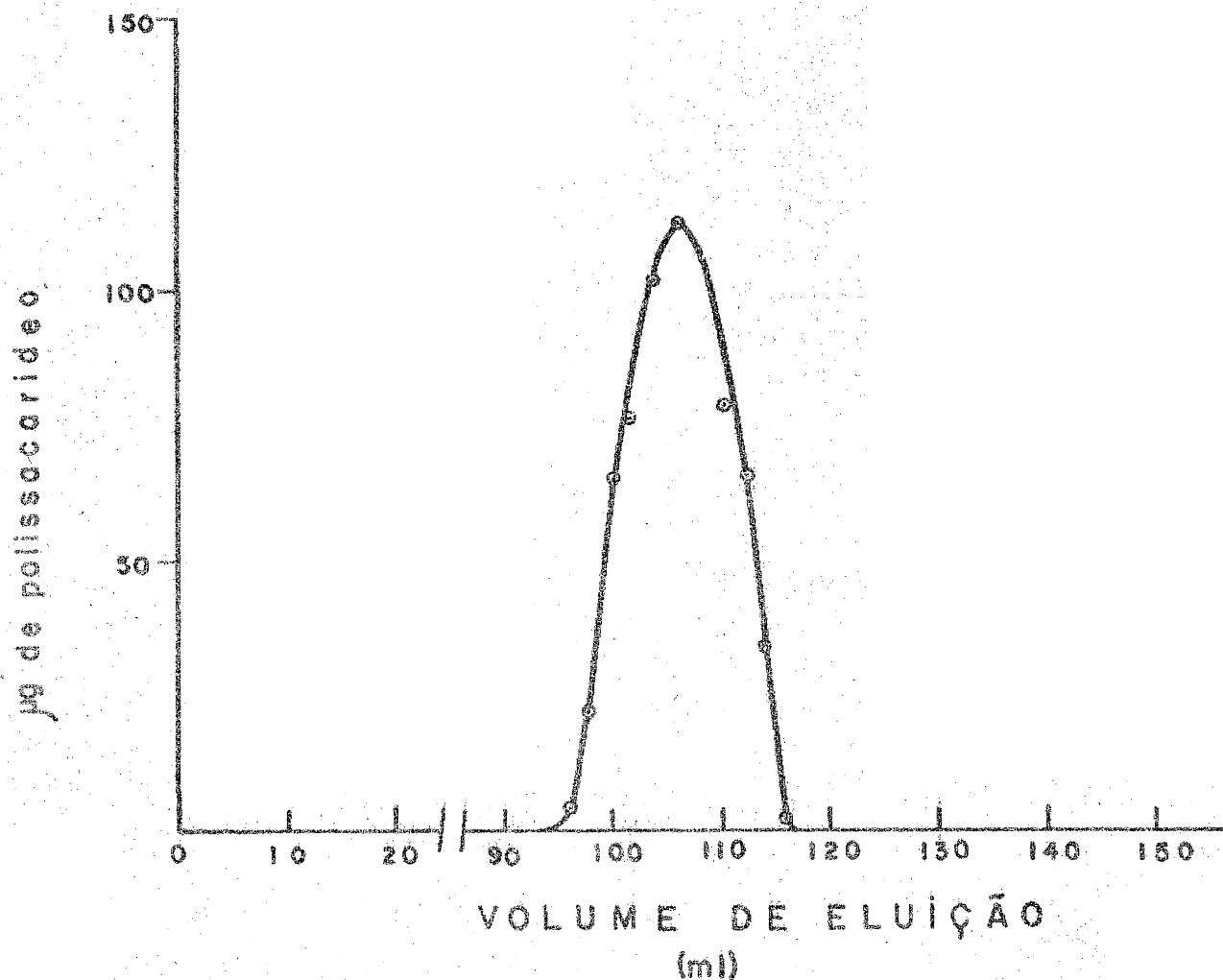


Fig. 1 - Cromatografia do polissacarídeo em coluna de Sephadex G-200 (80x2cm d.i.). A amostra analisada (6,5mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 8ml/hora. Frações de 2ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação do açúcar total (método do fenol-ácido sulfúrico) (31). O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 96 a 117ml do eluato, com pico máximo no volume de 107ml. A recuperação do polissacarídeo foi de 100%. O "Dextran-blue 2.000" foi eluído dessa coluna nos volumes de 96 a 116 ml do eluato (pico máximo no volume de 106ml).

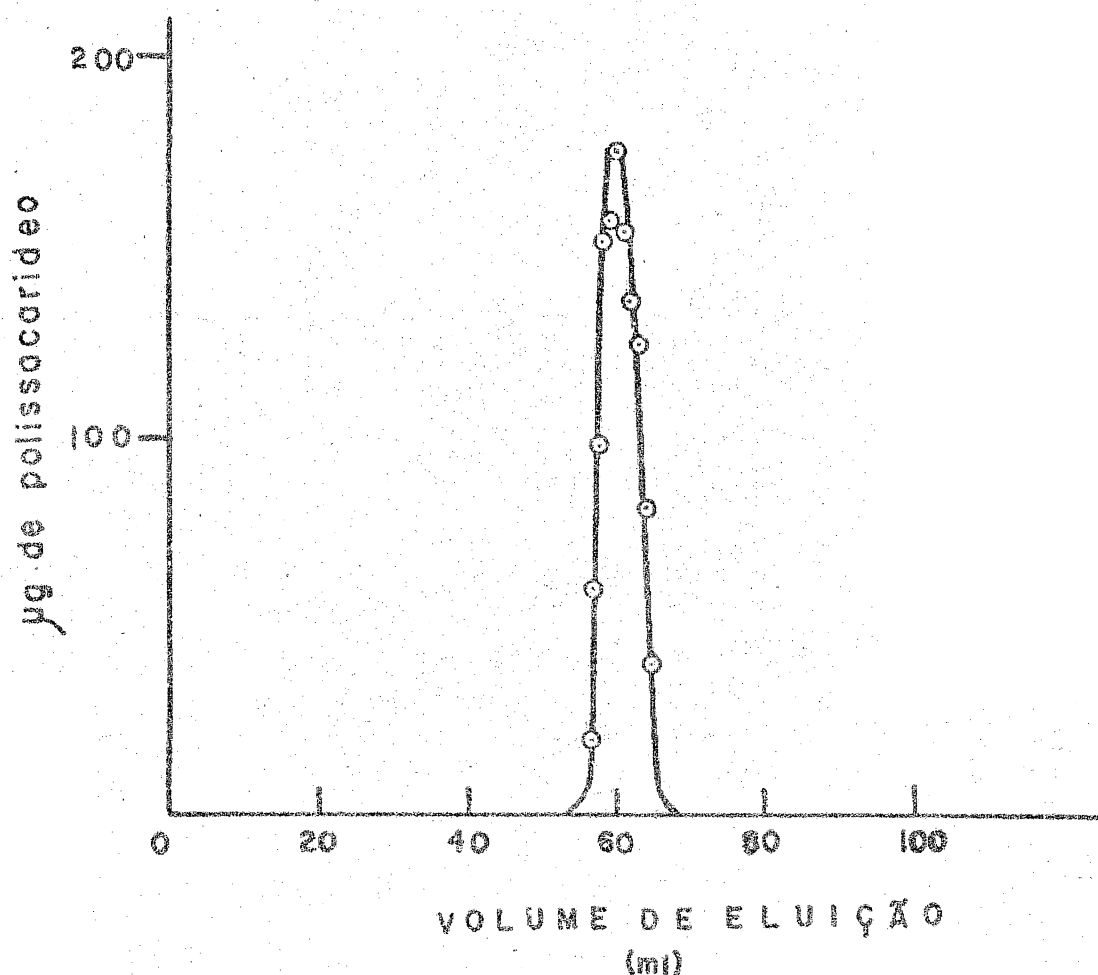


Figura 2 - Cromatografia do polissacarídeo em coluna de agarose a 2% (90, 0x1, 5cm d.i.). A amostra analisada (5,7mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 3ml/hora. Frações de 0,5ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação do açúcar total (31). O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 56,5 a 65,0 ml do eluato, com pico máximo em 60 ml de eluato. A recuperação do polissacarídeo foi de 90%. O "Dextran-blue 2.000" não foi eluído dessa coluna.

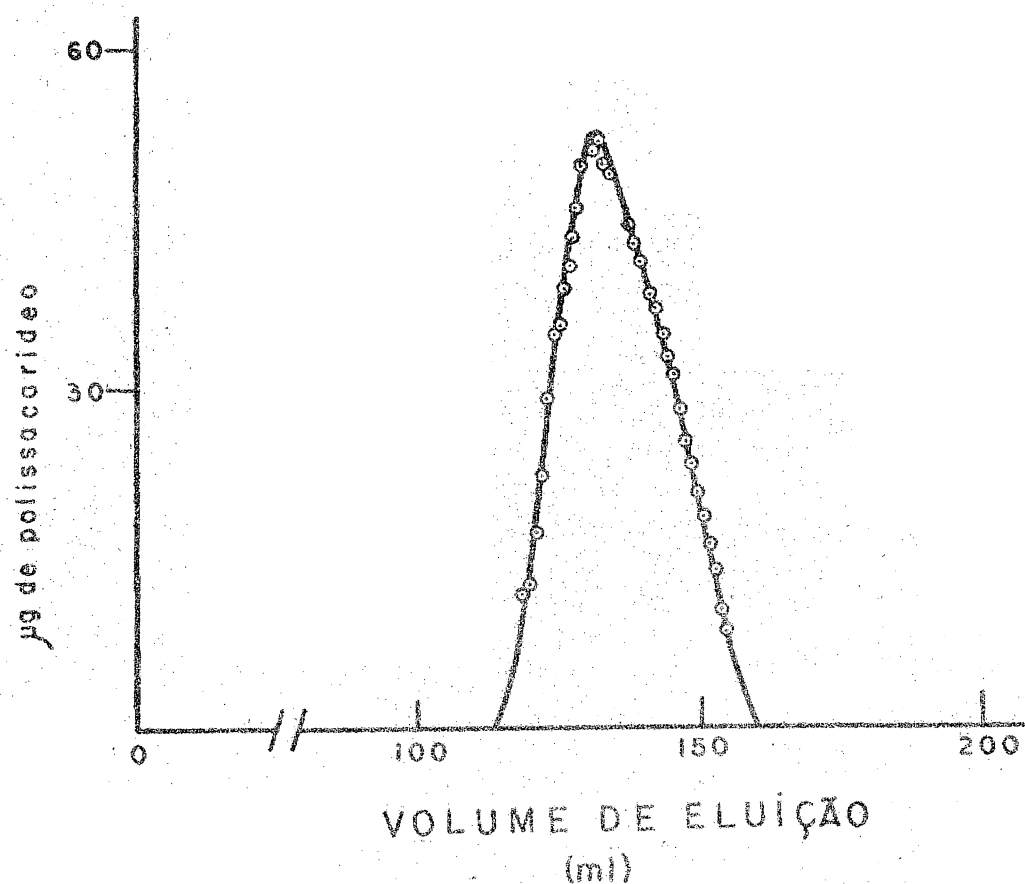


Figura 3- Cromatografia do polissacarídeo em coluna de agarose a 4% (90,0x2,1cm d.i.). A amostra analisada (6,56mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 4ml/hora. Frações de 1ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,2ml para determinação do açúcar total (31). O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 118 a 155ml, com pico máximo em 133ml de eluato. A recuperação do polissacarídeo foi de 94%. O "Dextran-blue 2.000" foi eluído dessa coluna nos volumes de 115 a 130ml do eluato (pico máximo no volume de 120ml).

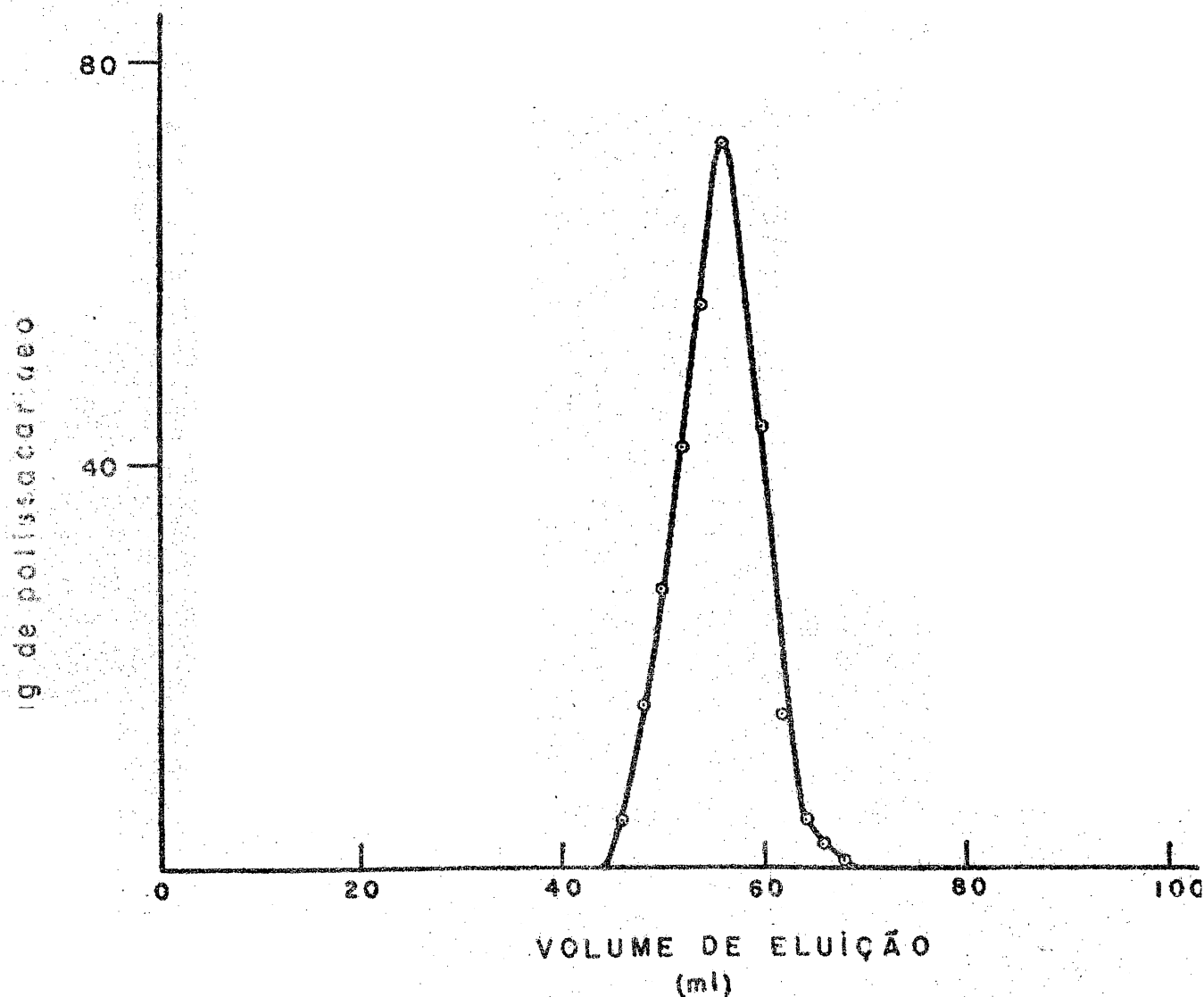


Figura 4 - Cromatografia do polissacarídeo em coluna de Sepharose 6 B-100 (97, 0x1, 7cm d. i.). A amostra analisada (3, 7mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 12ml/hora. Frações de 2ml do eluato foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 0, 2ml para determinação do açúcar total. O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 46 a 70ml do eluato, com pico máximo no volume de 58ml do eluato. A recuperação do polissacarídeo foi de 99%. O "Dextran - blue 2. 000" foi eluído dessa coluna nos volumes de 48 a 68ml do eluato (pico máximo no volume de 55ml).

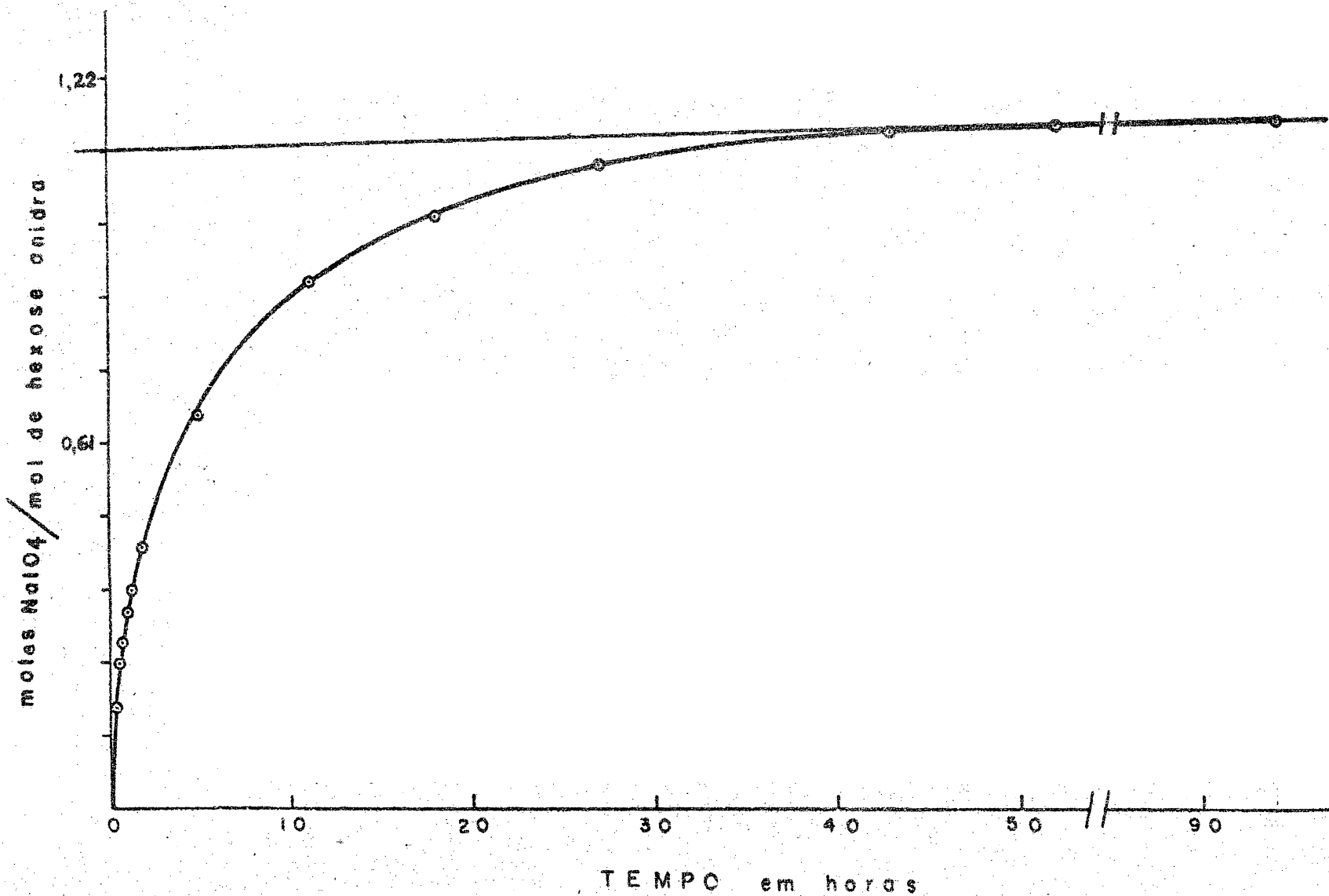


Figura 5- Determinação do consumo de periodato do polissacarídeo. A amostra analisada(50mg) foi oxidada com m-periodato 0,01N(100ml). A diferentes intervalos de tempo foram coletadas alíquotas(5ml) para a determinação do consumo de periodato(33) e os valores obtidos foram extrapolados para o tempo zero. O ácido fórmico liberado nessa reação também foi determinado(34)(35).

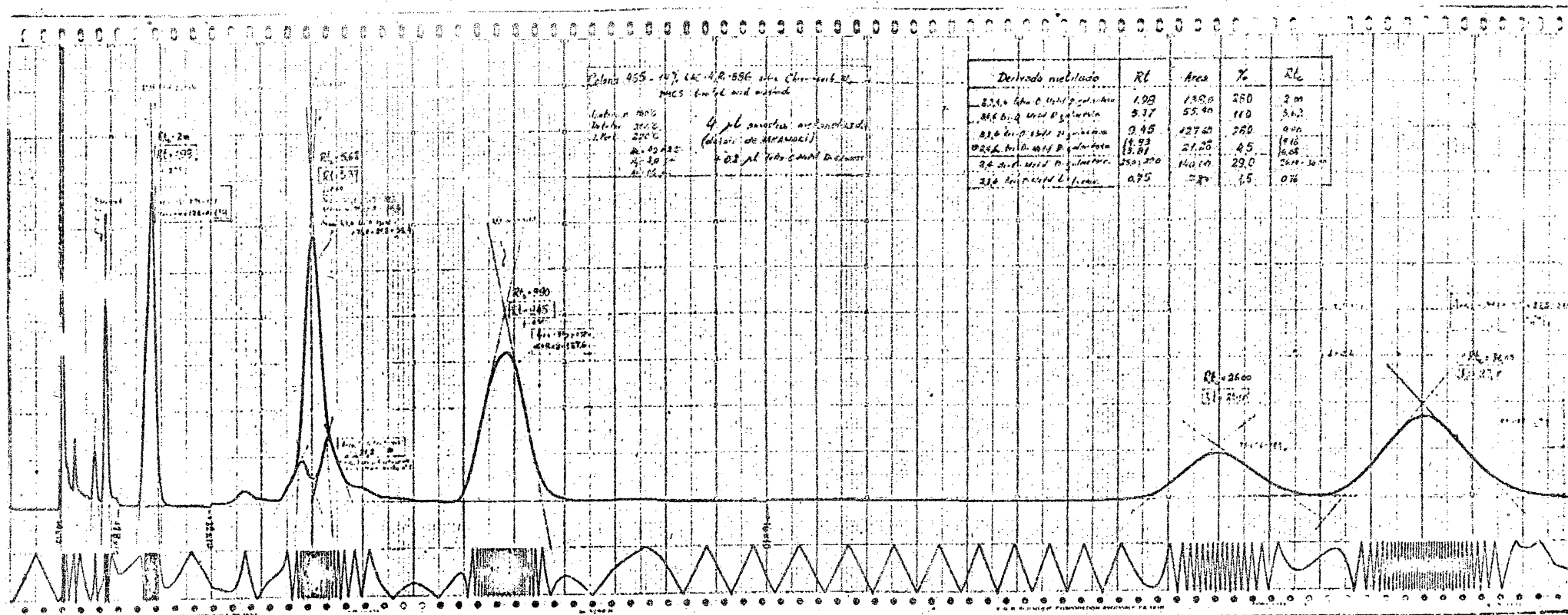


Figura 6 - Cromatografia em fase gasosa dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado.
 Cromatógrafo F & M modelo 810 R-12 com detetor de ionização de chama.
 Coluna: 14% p/p LAC-4 R-886 sobre chromosorb W de 80-100 mesh (DMSC), de
 100 x 0.4 cm (d.i.) a 160°C (isoterma), com detetor a 250°C, câmara de injeção a
 220°C e fluxo de hélio de 40 ml/min.

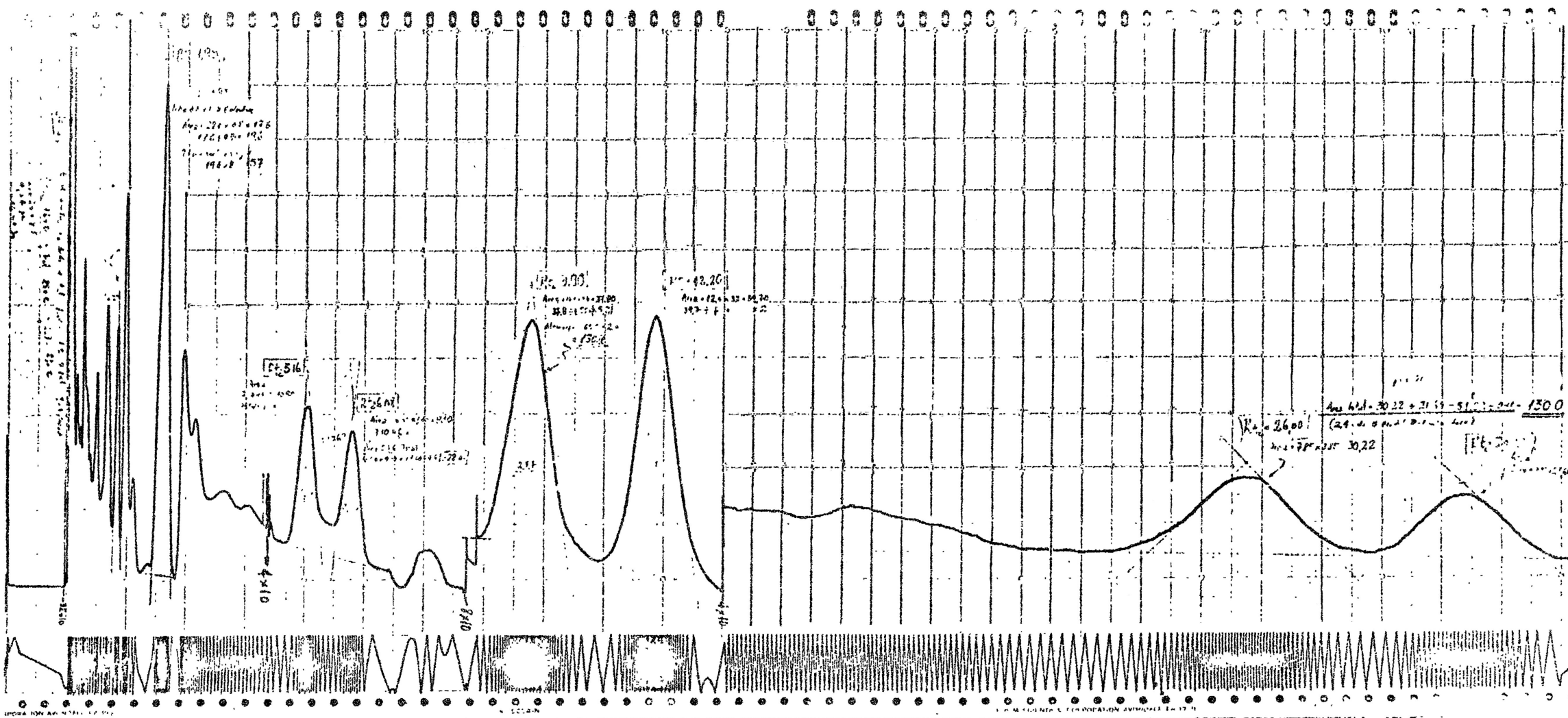


Figura 7 - Cromatografia em fase gasosa dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado, após oxidação pelo periodato e posterior glicosidação de Fischer.

Cromatografo F & M modelo 810 R-12 com detetor de ionização de chama.

Coluna: 14% p/p LAC-4-R-886 sobre Chromosorb W de 80-100 mesh (DMSC), de 100 x 0.4 cm (d.i.) a 160°C (isoterma), com detetor a 250°C, câmara de injeção a 220°C e fluxo de hélio de 40 ml/min.

TABELA I .

Análise por GLC dos produtos da degradação de Smith
do polissacarídeo de massa de ovos de Ampularia sp.

Alditol acetato	Tempo de retenção (T)*	Moles %
Glicerol-tri	0,08	72
Dulcitol-hexa	3,11	28
Glicerol:Dulcitol	-	2,57:1

*Tempo de retenção relativo ao L-arabinitol penta-
-acetato(coluna d).

TABELA II

Análise por GLC dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado

D e r i v a d o	Tempos relativos de retenção (T) *			Moles % **
	Coluna (a)	Coluna (b)	Coluna (c)	
metil 2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-galactopiranosídeo	1, 80	1, 58	2, 00	28, 00
metil 2, 4, 6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	-	-	5, 16 6, 08	4, 50
metil 3, 4, 6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	4, 10	2, 22	5, 62	11, 00
metil 2, 3, 4-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	6, 60	2, 90	9, 90	26, 40
metil 2, 4-di-0-metil-D-galactopiranosídeo	15, 00 16, 90	3, 80 4, 40	26, 00 30, 00	29, 00
metil 2, 3, 4-tri-0-metil-fucopiranosídeo	0, 76	0, 73	0, 76	1, 50

* Tempos de retenção relativos ao metil 2, 3, 4, 6-tetra-0-metil- β -D-glucopiranosídeo

** Determinados na coluna (c)

TABELA III

Análise em GLC de metil-D-glicosídeos metilados de polímero metilado de massa de ovos de Ampularia sp.

Derivados metilados	Tempos de retenção (T) *			
	Após metanólise **		Após hidrólise e oxidação ***	Derivados metilados **** parcialmente purificados
metil 2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-galactopiranosídeo	2, 00		2, 00	-
metil 3, 4, 6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	5, 62		-	5, 62
metil 2, 3, 4-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	9, 90		9, 90	-
metil 2, 4, 6-tri-0-metil-D-galactopiranosídeo	5, 16	6, 08	5, 16 6, 08	-
metil 2, 4-di-0-metil-D-galactopiranosídeo	26, 00	30, 00	26, 00 30, 00	-
metil 2, 3, 4-tri-0-metil- fucopiranosídeo	0, 76		0, 76	-
Derivado metilado resultante da oxidação pelo m-periodato de sódio	-		12, 20	-

* Tempos de retenção dos derivados metilados obtidos na coluna (c) e referidos no β -0-metil-2, 3, 4, 6-tetra-0-metil-D-glucosídeo (T= 1,00 em 4 minutos).

** Derivados metilados obtidos após metanólise do polissacarídeo metilado.

*** Derivados obtidos após hidrólise ácida seguida de oxidação com m-periodato de sódio.

**** Derivados metilados isolados por cromatografia em camada delgada utilizando-se o solvente (n).

CONCLUSÕES

- 1) A massa de ovos de Ampulária sp., (Morretes), contém um heteropolissacarídeo formado de resíduos de D-galactose (98 %) e fucose (2%).
- 2) Os dados de metilação indicam que o polissacarídeo investigado apresenta ramificações apenas nos carbonos C_3 e C_6 dos resíduos internos da molécula, e que a proporção destes resíduos ramificados é menor do que a dos resíduos que constituem as cadeias lineares.
- 3) Os resíduos de fucose se encontram nas extremidades não redutoras da molécula.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Hazencleve Duarte, pelo apoio e dedicação oferecidos na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Alexander Dmytraczenko, pela inestimável ajuda prestada.

Aos professores e amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná que, de uma ou outra forma, colaboraram com a realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hammarsten O., Pflüger's Arch., 36: 373, 1885.
2. May F., Z. Biol., 91: 215, 1931.
3. May F., Z. Biol., 92: 319, 1932.
4. May F., Z. Biol., 92: 325, 1932.
5. May F., Z. Biol., 95: 277, 1934.
6. Baldwin E. and Bell D. J., J. Chem. Soc., 1461, 1938.
7. Bell D. J. and Baldwin E., J. Chem. Soc., 1251, 1941.
8. May F. und Weinland H., Z. physiol. Chem., 296: 154, 1954.
9. May F. und Weinland H., Z. physiol. Chem., 305: 75, 1956.
10. Weinland H., Z. physiol. Chem., 305: 87, 1956.
11. May F. und Weinland H., Z. physiol. Chem., 305: 207, 1956.
12. Schlubach H. H. und Loop W., Annalen., 532: 228, 1937.
13. O'Colla P., Proc. R. I. A. sect. B., 5: 165, 1953.
14. Correa J. B. Dmytraczenko A., and Duarte J. H., Carbohyd. Res., 3: 445, 1967.
15. Duarte J. H. and Jones J. K. N., Carbohyd. Res., 16: 327, 1971.
16. Diaz E. A., tese de mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica da UFP, 1972.
17. Honda N. K., tese de mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica da UFP, 1973.
18. Geldmacher-Mallinckrodt M. und Horstmann H. J., Z. physiol. Chem., 333: 226, 1963.
19. Weinland H., Biochemische Zeitschrift, 324: 19, 1953.
20. May F., Z. Biol., 95: 401, 1934.
21. May F., Z. Biol., 95: 614, 1934.

22. Horstmann H.J., Biochemische Zeitschrift, 328: 342, 1956.
23. Sampaio J.C., tese de mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica da UFP, 1973.
24. Dudman W.F. and Bishop C.T., Can. J. Chem., 46: 3079, 1968.
25. Aspinall G.O., J. Chem. Soc., 1676, 1963.
26. Stephen A.M., Kaplan M., Taylor G.L. and Leisegang E.C., Tetrahedron suppl. 7: 233, 1966.
27. Gunner S.W., Jones J.K.N. and Perry M.B., Can. J. Chem., 39: 1892, 1961.
28. Sawardeker J.S., Sloneker J.H. and Jeanes A., Anal. Chem., 37: 1602, 1965.
29. Trevelyan E.W., Procter D.P. and Harrisson J.S., Nature, 166:444, 1950.
30. Hough L., Jones J.K.N. and Wadman W.H., J. Chem. Soc., 1702, 1950.
31. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F., Anal. Chem., 28: 350, 1956; Nature, 168: 167, 1951.
32. Sevag M.G., Biochem. Z., 273: 419, 1934.
33. Neumüller G. and Vasseur E., Arkiv Kemi, 5: 235, 1953.
34. Barker S.A. and Somers P.J., Carbohydr. Res., 3:220, 1967.
35. Anderson D.M., Greenwood C.T. and Hirst E.L., J. Chem. Soc., 225, 1955.
36. Hay G.W., Lewis B.A. and Smith F., Methods Carbohydr. Chem., 5: 357, 1965.
37. Haworth W.N., J. Chem. Soc., 107:8, 1915.
38. Falconer E.J. and Adams G.A., Can. J. Chem., 34: 338, 1956.

39. Adams G.A. and Bishop C.T., Can. J. Chem., 38 2380, 1960.
40. Sandford P.A. and Conrad H.E., Biochemistry, 5: 1508, 1966.
41. Hirst E.L. and Percival E., Methods Carbohyd. Chem., 5: 287, 1965.
42. Parikh V.M. and Jones J.K.N., Can. J. Chem., 44: 327, 1966.
43. Ferrier R.J. and Collins P.M., Monosaccharide chemistry,
Penguin Books Ltd., London, William Clowes & Sons Limited,
1972, p. 47.